

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-110894

(43)Date of publication of application : 28.04.1997

(51)Int.Cl.

C07H 21/02
A61K 31/70
A61K 48/00
C07H 21/04
C12N 15/09

(21)Application number : 07-268442

(71)Applicant : SOYAKU GIJUTSU
KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 17.10.1995

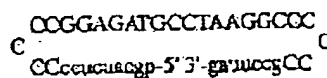
(72)Inventor : TAKAKU HIROSHI
TAKAI KAZUYUKI
ISHIBASHI TOSHIAKI
YAMAKAWA HIDESHI

(54) HYBRIC DNA/RNA OLIGONUCLEOTIDE AND ANTIVIRAL AGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new nucleic acid having plural hairpin loop portions, with the intramolecular base sequence composed by an anti-sense DNA complementary to the target RNA and a sense RNA, having nuclease resistance, thus useful as, e.g. an antiviral agent.

SOLUTION: This new hybrid DNA/RNA oligonucleotide has a base sequence of the formula (A is an adenosine residue; T is a thymidine residue; G is a guanosine residue; C is a cytidine residue; (a), (u), (g) and (c) are each corresponding ribonucleotide, the linkage between nucleotides is phosphodiester linkage; (p) is a phosphate group), etc., having at least two hairpin loop portions, with the intramolecular base sequence composed by an anti-sense DNA complementary to the target RNA and a sense RNA, and having resistance to the decomposing action by various kinds of nuclease in vivo, therefore being useful as e.g. an antiviral agent against virus such as HIV.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-110894

(43)公開日 平成9年(1997)4月28日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 21/02			C 0 7 H 21/02	
A 6 1 K 31/70	ADY		A 6 1 K 31/70	ADY
48/00			48/00	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	Z
C 1 2 N 15/09	ZNA	9162-4B	C 1 2 N 15/00	ZNAA
審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 10 頁)				

(21)出願番号 特願平7-268442

(22)出願日 平成7年(1995)10月17日

(71)出願人 592198703

株式会社創業技術研究所

福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1

(72)発明者 高久 洋

千葉県船橋市習志野台1丁目6-8

(72)発明者 高井 和幸

千葉県千葉市花見川区朝日ヶ丘町3204-51

(72)発明者 石橋 利明

千葉県千葉市花見川区西小中台町5丁目6
棟301号

(72)発明者 山川 秀史

千葉県船橋市前原西4丁目6-15 プレイ
スセトル203号

(74)代理人 弁理士 佐々木 功 (外1名)

(54)【発明の名称】 ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド及び抗ウイルス剤

(57)【要約】

【課題】 ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドを含有する抗ウイルス剤を提供する。

【解決手段】 ヘアピンループ部分を少なくとも2つ有しており、標的RNAに相補的なアンチセンスDNAとセンスRNAとにより分子内塩基配列が組まれているハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドである。このヌクレオチドは標的部位のRNase IIにより自己のセンスRNA領域が分解され、これによって露呈したアンチセンスDNA領域が標的となるRNAと二重鎖を形成して標的RNAを分解する。

【効果】 本発明によるオリゴヌクレオチドは自体安定な塩基対を形成し、生体に存在する各種のヌクレアーゼによる分解作用に対して耐性を有している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともヘアピンループ部分を2つ有しており、標的RNAに相補的なアンチセンスDNAと、センスRNAとにより分子内塩基配列が組まれていることを特徴とする、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項2】 ヘアピンループ部分を2つ有しており、ハンマーヘッド型であることを特徴とする、請求項1に記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項3】 ハンマーヘッド型であり且つ環状であることを特徴とする、請求項2に記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 ハンマーヘッド型であり且つ一箇所にニックを有していることを特徴とする、請求項2に記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項5】 ハンマーヘッド型であり且つステム部分のセンスRNA側にニックを一箇所有していることを特徴とする、請求項4に記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項6】 ループ部分に少なくとも1つのホスホロチオエート結合を有していることを特徴とする、請求項1-5の何れか一つに記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

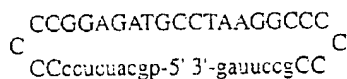
【請求項7】 ループ部分がすべてホスホロチオエート結合であることを特徴とする、請求項1、2、4又は5に記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 ウイルスのRNA遺伝子に対して相補的であるアンチセンスDNAを有していることを特徴とする、請求項1-7の何れか一つに記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項9】 ウイルスがHIV (Human Immunodeficiency Virus)であることを特徴とする、請求項8に記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 RD5 (配列番号 1) :

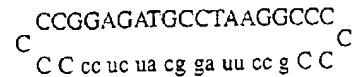
【化1】



(式中、Aはアデノシン残基、Tはチミジン残基、Gはグアノシン残基、Cはシチジン残基を意味し、小文字のa、u、g及びcは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ヌクレオチド間の結合はホスホジエステル結合であり、pは燐酸基を意味する)にて示される塩基配列を有していることを特徴とする、請求項1-9の何れか一つに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項11】 RD5C (配列番号 2) :

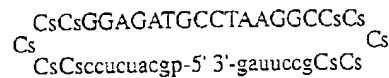
【化2】



(式中、Aはアデノシン残基、Tはチミジン残基、Gはグアノシン残基、Cはシチジン残基を意味し、小文字のa、u、g及びcは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、ヌクレオチド間の結合はホスホジエステル結合である)にて示される塩基配列を有していることを特徴とする、請求項1-9の何れか一つに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項12】 RD5S (配列番号 2 に相当) :

【化3】



(式中、Aはアデノシン残基、Tはチミジン残基、Gはグアノシン残基、Cはシチジン残基であり、小文字のa、u、g及びcは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、sはホスホロチオエート結合であり、他のヌクレオチド間の結合はホスホジエステル結合であり、pは燐酸基を意味する)にて示される塩基配列を有していることを特徴とする、請求項1-9の何れか一つに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項13】 請求項1-12の何れか一つに記載のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドを有効成分として含有していることを特徴とする、抗ウイルス剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する抗ウイルス剤に係る。

【0002】

【従来の技術】 疾患に係る遺伝子を核酸断片により不活化し、生体に望ましくない遺伝子産物を産生させなくしたり、寄生物の増殖を抑制して遺伝子治療を行なう方法は「アンチセンス技術」として近年医学分野で脚光を浴びている。アンチセンス法は高い可能性を秘めた魅力的な遺伝子制御方法であるが、実際に医療の場において使用する場合には、アンチセンス分子の投与方法、ドラッグデリバリーシステムへの利用、ドラッグターゲティングシステムへの利用、代謝安全性、低免疫原性、体内排泄、高活性体であること等の条件を満たすことが最低限必要であり、未だこのような、機能性に富みしかも安全性の高いアンチセンス分子は発見されていない["Biochemistry", Vol. 16, page 1988 (1977)「アンチセンス技術」及び"Proc. Natl. Acad. Sci. USA.", Vol. 84, page 7706 (1987)「エイズウイルス阻害法」等]。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 一本鎖RNAを遺伝子

とするレトロウィルスは、宿主細胞内で複製し増殖する寄生体であり、宿主細胞の働きを利用して増殖に必要なタンパク質を合成する。レトロウィルスが宿主細胞に感染すると、逆転写酵素("Reverse Transcriptase"、以下「rev タンパク質」と称する)の働きによりRNAからDNAが合成される。後天性免疫不全症候群(AIDS)を引き起こすHIV(Human Immunodeficiency Virus)もレトロウィルスに属し、T4リンパ球を宿主細胞とし、その細胞内で複製し増殖する。

【0004】レトロウィルスの代表例として、HIVライフサイクルを図1に示す。HIVの親ウィルスが宿主細胞に吸着するとウィルスRNAが逆転写酵素により一本鎖DNAに転写され、二本鎖DNAになって染色体DNAに組み込まれる。このプロウィルスDNAは、潜伏期間中に宿主の染色体DNAと共に複製される。このDNAは様々な機能を有し、何らかの刺激が与えられると、RNAへの転写が行われ、HIVの子ウィルスが発生する。従って、宿主細胞のタンパク質合成系においてmRNAからタンパク質が合成されるステップで、アンチセンスオリゴヌクレオチドを結合させることができれば、ウィルス増殖を効果的に阻止することができる筈である。

【0005】しかしながら、ターゲット遺伝子の特定領域の塩基配列に相補的な塩基配列を有するだけのアンチセンスオリゴヌクレオチドを生体内に導入しても、生体内に存在する種々の核酸分解酵素[ヌクレアーゼ(Nuclease)]により簡単に分解されてしまい、ターゲット遺伝子と結合する前に消失し、目的とする効果を得ることは事実上不可能であるか、或いは極めて困難である。これを解決するために、ホスホロチオエート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドが一般に利用されているが、ホスホロチオエート結合はR体とS体の混合重合体であるために、ターゲットに対する塩基対形成能が低下する。そこで、ターゲット部位にはホスホロチオエート結合を使用せず、核酸分解酵素に対する耐性を増加することが必要となる。

【0006】本発明者等は生体内で安定に存在し、しかもターゲット領域の遺伝子に対する結合能が低下しないアンチセンスオリゴヌクレオチドを得るべく鋭意検討した結果、少なくともヘアピンループ部分を2つ有しており、標的RNAに相補的なアンチセンスDNAと、センスRNAとで、分子内塩基配列を組むことを特徴とする、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドによって上記の課題を解決することができることを見出し、且つこのようなオリゴヌクレオチドが安全性において優れていることを見い出して本発明を完成するに至った。

【0007】

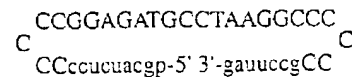
【課題を解決するための手段】従って、本発明は、少なくともヘアピンループ部分を2つ有しており、標的RNA

Aに相補的なアンチセンスDNAと、センスRNAとで、分子内塩基配列を組むことを特徴とする、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドを提供するものである。更に、本発明は該ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド類を有効成分として含有していることを特徴とする、抗ウィルス剤を提供するものである。

【0008】本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドの数例を示せば下記の通りである。

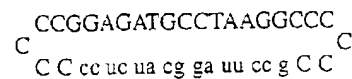
【0009】RD5(配列番号1):

【化4】



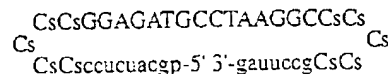
RD5C(配列番号2):

【化5】



RD5S(配列番号3):

【化6】



(上記の各式中において、Aはアデノシン残基、Tはチミジン残基、Gはグアノシン残基、Cはシチジン残基を意味し、小文字のa、u、g及びcは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、sはホスホロチオエート結合であり、他のヌクレオチド間の結合は、ホスホジエステル結合であり、pは燐酸基を意味する)

【0010】尚、上記のオリゴヌクレオチド以外にも、以下の条件を満たすものであれば同様な活性を有していることが予測され、従って本発明は本明細書に具体的に開示された化合物に限定されるものではない。

【0011】本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドについての特性は以下に記載されている通りに纏めることができる、即ち、本発明のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは標的RNAに対して相補的な塩基配列からなるアンチセンスDNA領域と、センスRNA領域とを含んでいる。ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドを細胞内に存在させると、例えば、宿主細胞内でハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドのRNA領域が分解され、アンチセンスDNA領域が露呈し、宿主細胞の核からウィルスのゲノムRNAが放出された場合に、そのゲノムRNAにアンチセンスDNA領域が結合し、細胞質内の酵素によってゲノムRNAが分解されるので、子ウィルスの発生を防止することができる。又、宿主細胞の染色体DNAに取り込まれたウィルスDNAから転写されたmRNAが、宿主細胞の核から細胞質に放出された場合にも、そのmRNAに露呈したアンチセンスDNA領域が

結合し、タンパク質の翻訳をブロックするか、或いは細胞質内の酵素によってmRNAが分解されるので、この場合にも子ウィルスの発生を防止することができる。

【0012】標的となるRNAは、RNA遺伝子、またはmRNAの内、本発明のアンチセンスDNA領域と結合させてRNAの複製、mRNAへの転写及び／又はmRNAからタンパク質への翻訳、更にはRNAからDNAへの逆転写を阻害し、それらRNAが有する正常な機能を発揮させないようにされる対象となるRNAである。

【0013】標的RNAとしては、RNAウイルス、例えばインフルエンザウイルス、ライノウイルス、ポリオウイルス、HIV、HTLV-1等のRNA遺伝子の部分塩基配列、例えばタンパク質合成開始部位などを選択することができ、又DNA遺伝子からのmRNAやRNAウイルスのプロウィルスDNAから転写されるmRNAの全配列又は部分配列、特に rev タンパク質をコードする rev 領域又はその部分配列を挙げることができる。

【0014】本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び／又はそれらの修飾体から形成することができ、塩基数は特に限定されるものではないが、2つのヘアピンループ構造を形成することができ、相補的塩基配列を決める最小の単位は、一般的は38-76塩基であり、ヘアピンループ構造が2つ以上の場合はこれに限定されるものではない。

【0015】ヘアピンループ構造は、環状一本鎖のループ領域と、そのループ領域端部から始まる二本鎖のステム領域とからなり、ヘアピンループ構造を構成する塩基数は特に限定されるものではないが、一般にはループ領域は4-8塩基、ステム領域は15-30塩基である。アンチセンス領域は前記のヘアピンループ構造と別個に形成されていても、或いはアンチセンス領域の全体または一部がヘアピンループ構造の全体または一部と一致していても差し支えない。

【0016】アンチセンス領域を構成する塩基数は特に限定されるものではなく、一般に15-46塩基である。本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド内においてアンチセンス領域は連続して存在する必要はなく、標的RNAと二重鎖を形成することができる限り、非相補的塩基1またはそれ以上が1またはそれ以上の箇所て相補的塩基対配列内に介在していても差し支えない。

【0017】本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンス領域以外の各磷酸エステルの内少なくとも1箇所以上にホスホロチオエート結合を導入することができる。ホスホロチオエート結合とは、磷酸ジエステル結合の酸素原子を硫黄原子で置換したものである。ホスホロチオエート結合を

導入した部位は、ヌクレアーゼに対する分解抵抗性が向上するので、ホスホロチオエート結合の導入数は多い程好ましいが、アンチセンスDNA領域に導入するのはRNase H に対する特異性が低下するので好ましくない。

【0018】尚、ホスホロチオエート結合を環状ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドに導入する場合にはステム領域及びループ領域を構成する塩基数により、その導入数を調整する必要がある。これはループ領域を全てホスホロチオエート結合に含めた場合には、ステム領域の塩基数によって RNase H に対する安定性も向上し、RNase H により分解され難い環状ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドが形成されることがあるためである。

【0019】本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート結合を導入する部位を除いては、通常のホスホジエステル法またはホスホトリエステル法、例えば H-ホスホネート法、またはホスホロアミダイト法によるDNA/RNA自動合成機を利用して合成することができる。ホスホロチオエート結合を有するハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは、通常のポリヌクレオチド合成に用いられる酸化剤で水/沃素/ピリジン/テトラヒドロフランの代わりに、15%N, N, N', N'-テトラエチルチオラムジスルフィド /アセトニトリルを用いて合成することができる。

【0020】更に、本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは、アンチセンスDNA領域とセンスDNA領域が安定なハイブリッド塩基対を形成するので、生体内に存在するヌクレアーゼによる分解に対しても抵抗性を有している。

【0021】ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドの安定性の指標としては、例えば融解温度（以下「T_m」と称する）を用いることができる。一般に、オリゴヌクレオチドをホスホロチオエート型にすると T_m 値は下がり、塩基対の安定性は減少する。しかしながら、本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドのハイブリッド型であり、分子内で安定した塩基対を形成することができるので、通常のデオキシリボヌクレオチドのみのDNA/DNAオリゴヌクレオチドと比較する場合に、T_m値は上昇し、塩基対は安定化する。又、ホスホロチオエート結合はアンチセンス領域には導入されないので、標的RNAとの塩基対形成能は低下しない。

【0022】翻って、生体内には数々のヌクレアーゼが存在する。例えば、3' 方向から分解する 3'-エキソヌクレアーゼ、5' 方向から分解する 5'-エキソヌクレアーゼや、中程から切断するエンドヌクレアーゼ、更にDNA又はRNAの二重鎖を認識してDNA又はRNAのみを分解する酵素（例えば RNase II）が存在する。後述

の実施例において示されているように、本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは3'-エキソヌクレアーゼ（ヘビ毒ホスホジエステラーゼ）やエンドヌクレアーゼ（SIヌクレアーゼ）の分解活性に対して抵抗性を有している。更に、細胞培養等の培地に用いる牛血清にも種々のヌクレアーゼが含まれているが、本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは牛血清中のヌクレアーゼに対しても抵抗性を有しているために牛血清含有培地からハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドを細胞に導入することが可能である。

【0023】尚、アンチセンス法において重要な作用に、標的となるmRNAに結合して形成される細胞内のDNA/RNA二重鎖の内、RNAを特異的に切断するリボヌクレアーゼ（RNase II）の働きがある。これを利用すれば、細胞内のタンパク質合成を阻害してウィルスの増殖を防止することができる。

【0024】本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは、mRNAとの結合力乃至安定性が高いために、他のアンチセンスDNAよりも有効な薬剤となり得る。以下においては実施例により本発明を更に具体的に且つ詳細に説明するが、本発明は実施例に記載される化合物、用途に限定されるものではないことに留意され度い。

【0025】

【発明の実施の形態】

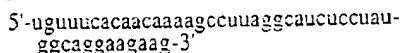
実施例1：オリゴヌクレオチドの合成

本実施例では、HIVのrevタンパク質をコードするmRNAに対する1種類のターゲットRNAと、1種類のセンスオリゴヌクレオチドと、7種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド（2種類の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドと、5種類のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチド）とを合成した。それらの構造は下記の通りである。

【0026】

sense-RNA (45mer HIV-1 rev RNA、配列番号 4)：

【化7】



sense-ODN (配列番号 5)：

【化8】



anti-ODN (配列番号 6)：

【化9】



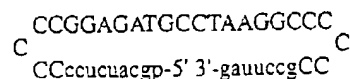
anti-ODNS (配列番号 6 に相当)：

【化10】



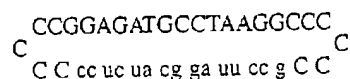
RD5 (配列番号 1)：

【化11】



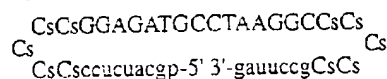
RD5C (配列番号 2)：

【化12】



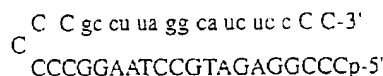
RD5S (配列番号 3)：

【化13】



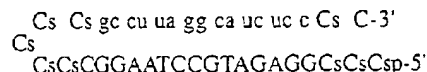
DRL5 (配列番号 7)：

【化14】



DRL5S (配列番号 7 に相当)：

【化15】



（これらの式中において、Aはアデノシン残基、Tはチミジン残基、Gはグアノシン残基、Cはシチジン残基を意味し、小文字のa、u、g及びcは、それぞれ、リボヌクレオチドであり、sはホスホロチオエート結合であり、pは磷酸基を意味する）

【0027】上記のRNAオリゴヌクレオチド、DNAオリゴヌクレオチド、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドの合成はホスホロアミダイト法により且つDNA/RNA自動合成機（ABI社製）を用いて合成した。ホスホロチオエート型のオリゴヌクレオチド（anti-ODNS、RD5S及びDRL5S）は通常のポリヌクレオチド合成に用いられる酸化剤である水/沃素/ピリジン/テトラヒドロフランの代わりに、15% N,N,N',N'-テトラエチルチオラムジスルフィド、アセトニトリルを用いて合成した。ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドの環状化はChemical phosphorylation reagent（Glen Research社製）を用いて、5'末端を磷酸化させたハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドをホスホロアミダイト法で合成した後に、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションすることにより得た。調製したオリゴヌクレオチドはポアクリルアミド電気泳動（PAGE）により分離し、ゲルから抽出し、エタノール沈殿または透析することにより精製した。

【0028】実施例2：オリゴヌクレオチドのTm（融解温度）測定

本実施例では、オリゴヌクレオチドの塩基対を形成させた後に温度を上昇させて吸光度曲線を求め、塩基対が割

がれる温度 (T_m) を指標として塩基対の安定性を評価した。前記の実施例1で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド0.150.D. 260を 10mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 7.0)、10mM NaCl 緩衝液により調製し、90°C で 10 分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷却して、塩基対を形成させた。反応液を UV セルに移し替え、1 分間に 1°C づつ上昇させながら、UV 測定器 (島津製作所

製の UV-2200A) で波長 260nm における吸光度を測定した。得られた吸光度曲線の一次微分により極大値を算出し、これを T_m 値とした。温度 (°C) と変性度 (%) との関係を図2-図7に示す。又、図2-図7の吸光度曲線より算出した T_m 値を下記の表1に示す。

【0029】

【表1】

Sequence	T_m (°C)
sense-ODN + anti-ODN	40
sense-ODN + anti-ODNS	33
sense-RNA + anti-ODN	41
sense-RNA + anti-ODNS	28
RD5	55
RD5C	81
RD5S	55
DRL5	65
DRL5S	65

【0030】sense-ODN + anti-ODN や sense-RNA + anti-ODN と比較する場合に、sense-ODN + anti-ODNS と sense-RNA + anti-ODNS は T_m が下がり、一本鎖オリゴヌクレオチドへのホスホチオエート結合の導入では、塩基対形成能が低下した。RD5S では RD5 と同様に T_m は低下せず、ループ部分へのホスホチオエート結合の導入は塩基対形成能を低下させることがなく、有効であった。又、RD5C の T_m は RD5 より高くなり、環状化することにより塩基対形成能が上昇し、オリゴヌクレオチドに安定化がもたらされることが判明した。

【0031】**実施例3**：ヘビ毒ホスホジエステラーゼを用いたオリゴヌクレオチドの耐性試験

本実施例では、オリゴヌクレオチドを 3'-エキソヌクレアーゼ活性を示すヌクレアーゼであるヘビ毒ホスホジエステラーゼ (以下「SVPD」と称する) を用いて、ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験を行った。SVPD は、通常の未修飾のオリゴヌクレオチドであれば、これを速やかに分解する。前記実施例1で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.1 O.D. 260 を 10mM Tris-HCl (pH 8.5)、10mM MgCl_2 及び 100mM NaCl から調製した緩衝液 0.7ml に溶解し、SVPD (ベーリンガーマンハイム社製) 0.1 μg を加えて、37°C で保温しながら、UV 測定器 (島津製作所製の UV-2200A) により波長 260nm での吸光度を1時間測定した。結果は図8に示されている通りであった。

【0032】未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODN は経時的に分解され、10 分後には大部分が分解されてしまった。これに対して RD5、RD5C、RD5S、DRL5 及びDRL5S は殆ど分解されなかった。これにより、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドはアンチセ

ンス部分にホスホチオエート結合を導入しなくても3'-エキソヌクレアーゼ活性を示すヌクレアーゼである SVPD に対して強い分解抵抗性を示すことが明らかとなった。

【0033】**実施例4**：SI ヌクレアーゼを用いたオリゴヌクレオチドの耐性試験

本実施例では、オリゴヌクレオチドをランダムに切断するエンドヌクレアーゼ活性を示す SI ヌクレアーゼを用いて、このヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験を行った。SI ヌクレアーゼは、通常の未修飾のオリゴヌクレオチドであれば、これを速やかに分解する。前記実施例1で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.1 O.D. 260 を 30mM CH_3COONa (pH 4.6)、280mM NaCl 及び 1mM ZnSO_4 から調製した緩衝液 0.7ml に溶解し、SI ヌクレアーゼ (Takara社製) 27.5 units を加えて 37°C で保温しながら、UV 測定器 (島津製作所製の UV-2200A) により波長 260nm での吸光度を 1 時間測定した。結果は図9に示される通りであった。

【0034】未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODN は経時的に分解され、10 分後には大部分が分解されてしまった。これに対して RD5、RD5C、RD5S、DRL5 及びDRL5S は殆ど分解されなかった。殊に、RD5C はホスホチオエート結合を導入した一本鎖のオリゴヌクレオチドである anti-ODNS よりも分解されなかった。ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドはアンチセンス部分にホスホチオエート結合を導入しなくてもエンドヌクレアーゼ活性を示す SI ヌクレアーゼに対して強い分解抵抗性を示すことが明かになった。

【0035】**実施例5**：ウシ血清を用いたオリゴヌクレオチドの耐性試験

本試験例では、10% FBSMEM 培地に対するオリゴヌクレオチドの耐性試験を行なった。前記の実施例1で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.2 O.D.260 を 10% FBS MEM 培地 100 μ l に添加し、37°C で保温しながら、3、6、12及び 24 時間反応させた。それぞれの反応液 20 μ l に水 20 μ l 及びフェノール：クロロホルム (1:1) 20 μ l を添加して攪拌し、15000 rpm で 10 分間遠心処理し、水層を抽出した。得られた水層 20 μ l を遠心エバポレート後、7M 尿素溶液 10 μ l に溶解させ、10% PAGE、7M 尿素、TBE で分析した。結果は図10に示される通りであった。未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODM が 24 時間後には完全に分解されたのに対して、RD5、RD5C、RD5S、DRL5 及び DRL5S は 24 時間後においても一部が分解されずに残留した。これから、本発明によるハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドはアンチセンス部分にホスホロチオエート結合を導入しなくても血清に対して分解抵抗性を示すことが明らかになった。

【0036】実施例6：オリゴヌクレオチドによる RNase H での標的RNAの分解

本実施例では、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドの RNase Hによる分解と、その分解によって露呈されたアンチセンス部分と標的RNAとの塩基対形成後の RNase H による標的RNAの分解能力を評価した。前記実施例1で調製したそれぞれのオリゴヌクレオチド 0.33nmol と標的RNA 0.33nmolを 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6)、10mM MgCl₂、100mM KCl、1mM DTT 緩衝液、RNase H 7.5 units、RNasin 12.7 units で 37°C 1、2 又は 4 時間反応させ、70%濃度となるように EtOH を添加し、-20°C で 30 分間以上冷却した後、15000rpm で 15 分間遠心処理することにより沈殿を得た。得られた沈殿を 9M尿素溶液 5 μ l に溶解し、10% PAGE、TBE、50°C の条件下で分析した。但し、オリゴヌクレオチドは反応前に 90°C で5分間加熱し、室温になるまで徐々に冷却したものを使用した。結果は図11及び12に示される通りであった。

【0037】未修飾のオリゴヌクレオチドである anti-ODN は標的RNAを 4 時間後にはほぼ完全に分解した。ホスホロチオエート結合を導入した anti-ODNS の場合には4 時間後でも標的RNAが一部分分解されずに残留した。一本鎖オリゴヌクレオチドへホスホチオエート結合を導入することにより、RNase H による標的RNAの分解能は低下した。RD5 と RD5C の場合には RNase H による標的RNAの分解はanti-ODN に比べて遅いが、標的RNAを分解した。分解が遅い理由は、一端、自体のセンスRNA領域が RNase H により分解されないこと、その後のアンチセンス領域と標的RNAとの二重鎖の形成、標的RNAの分解ができないからである。RD5S、DRL5 及び DRL5S の場合には RNase H による標的RNAの分解能はかなり低下したが、これは、自体のセン

スRNA領域が RNase H により分解され難いことに起因するものと推定された。これらの結果から、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドはヘアピンループ構造をとっていても、RNase H によって標的RNAを分解する活性を有していることが判明した。

【0038】

【発明の効果】本発明のハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは、それ自身で安定化した塩基対を形成し、生体内の各種ヌクレアーゼの分解に対して抵抗性を有しており、生体内、殊に標的部位の RNase H によって自己のセンスRNA領域が分解され、露呈されたアンチセンスDNA領域が標的となるRNAと二重鎖を形成し標的RNAを分解する。更に、このハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドは標的RNAを分解することから、ハイブリッドDNA/RNAオリゴヌクレオチドを含有する抗ウィルス剤は、ウィルスの増殖を阻害することができる。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：Yes

配列

gcaucuccCC CCCGGAGATG CCTAAGGCC CCCgccuag

配列番号：2

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：Yes

配列

gcaucuccCC CCCGGAGATG CCTAAGGCC CCCgccuag

配列番号：3

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：Yes

配列

gcaucuccCC CCCGGAGATG CCTAAGGCC CCCgccuag

配列番号：4

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：No

配列

uguuucacaa caaaagccuu aggcacuccc uauggcagga agaag

配列番号：5

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：No

配列

GCCTTAGGCA TCTCC

配列番号：6

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：Yes

配列

GGAGATGCCT AAGGC

配列番号：7

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

アンチセンス：Yes

配列

CCCGGAGATG CCTAAGGCCC CCCgccuuag gcaucuccCC

【図面の簡単な説明】

【図1】 HIV のライフサイクルを示す説明図である。

【図2】 sense-ODN + anti-ODN、sense-ODN + anti-ODN S、sense-RNA + anti-ODN 及びsense-RNA + anti-ODNS の場合の融解温度曲線である。

【図3】 図2に示された融解温度の一次微分曲線である。

【図4】 RD5、RD5C、RD5S 及び RD5SC の場合の融解温度曲線である。

【図5】 図4に示された融解温度の一次微分曲線である。

【図6】 DR5、DR5S、DRL5 及び DRL5S の場合の融解温度曲線である。

【図7】 図6に示された融解温度の一次微分曲線である。

【図8】 ヘビ毒ホスホジエステラーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験結果を示すグラフである。

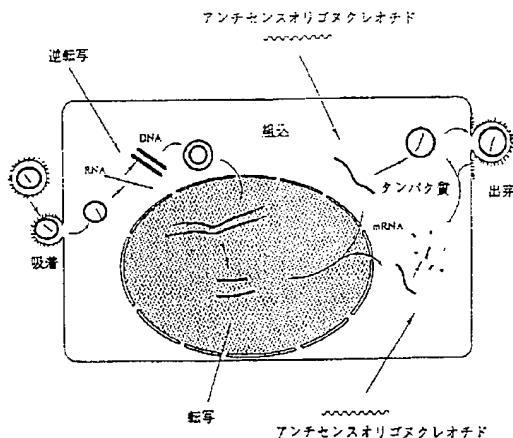
【図9】 SI ヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの耐性試験結果を示すグラフである。

【図10】 ウシ血清に対するオリゴヌクレオチドの耐性試験結果を示す電気泳動の撮影像である。

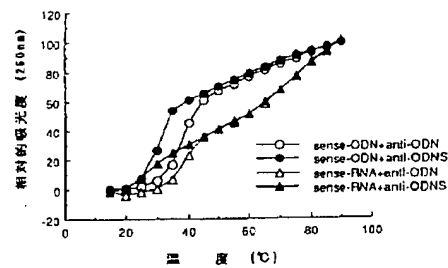
【図11】 オリゴヌクレオチドによる RNase H での標的 RNA に対する分解能を電気泳動により調べた結果を示す撮影像である。

【図12】 図11と同様の、但し他のヌクレオチドの場合を示す撮影像である。

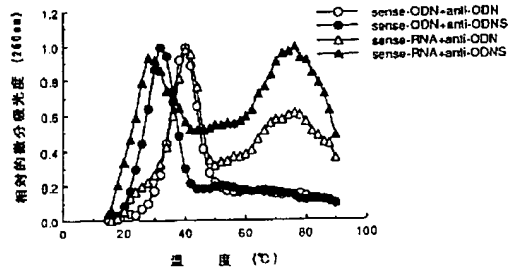
【図1】



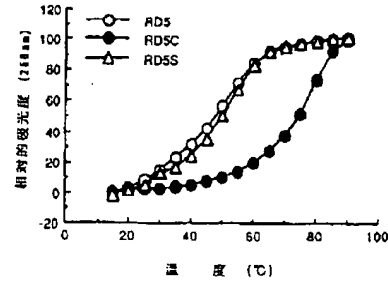
【図2】



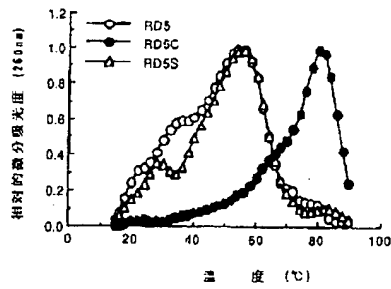
【図3】



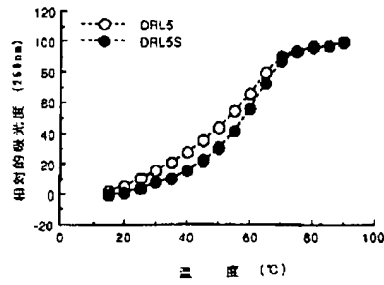
【図4】



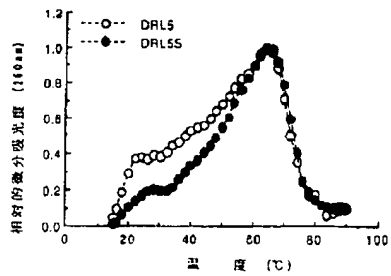
【図5】



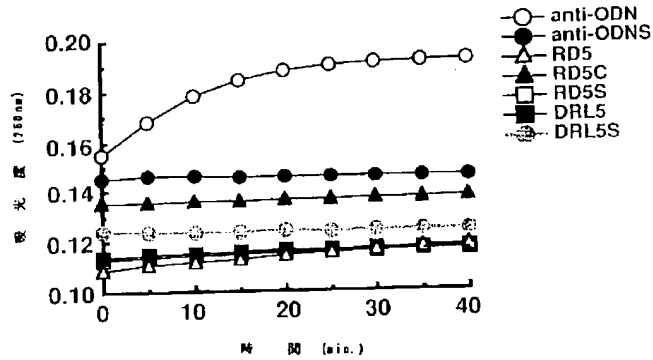
【図6】



【図7】



【図8】

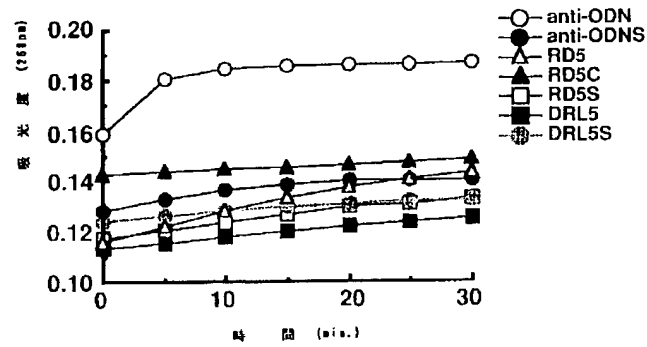


【図10】

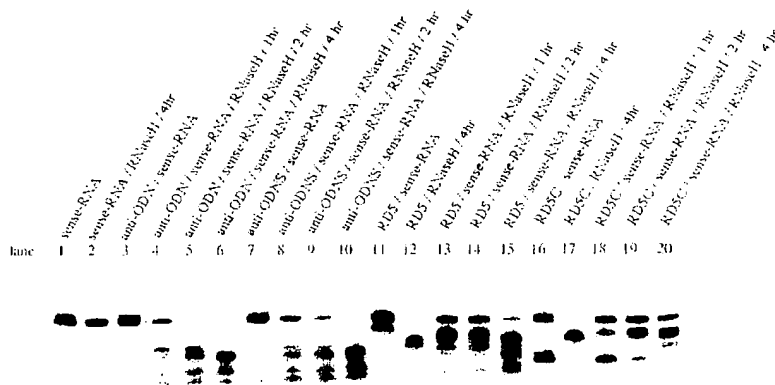
	anti-ODN					anti-ODNS					RD5					RD5C					RD5S					DRL5					DRL5S				
(hr)	0	3	6	12	24	0	3	6	12	24	0	3	6	12	24	0	3	6	12	24	0	3	6	12	24	0	3	6	12	24					
lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35



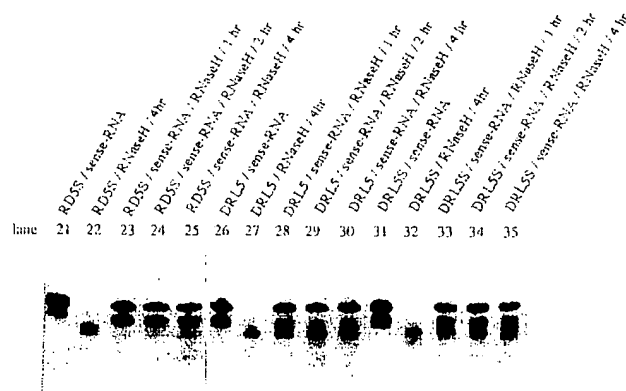
【図9】



【図11】



【図12】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.